



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

«مدیریت پژوهشی»

عنوان طرح پژوهشی:

«ارزیابی صفات فنوتایپی و ژنوتایپی سویه های *E. coli* اوروپاتوژنیک جدا شده
از بیماران مبتلا به عفونت ادراری (UTI) در جنوب ایران»

مجری طرح:

اکرم نجفی، دکتر سعید تاج بخش، دکتر محمد کارگر

همکاران طرح:

مجتبی حسن پور

سال ۱۳۹۲-۱۳۹۳

مقدمه نویسنده:

تجارب حاصله از این پروژه و پروژه های پیشین نشان می دهد که جهت سرعت بخشیدن به روند انجام کار و ارتقاء کیفیت نتایج، ضروری است که اعتبار مورد نیاز اجرای پروپوزال های مصوب شده در شورای پژوهشی به درستی دیده شده و به موقع نیز پرداخت گردد . هماهنگی های بین دانشگاه و سایر ارگان های مرتبط با پروژه نیز از جمله مواردی است که می تواند موجب کندی روند کار پروژه شود . بنابراین پیشنهاد می گردد با ارگان هایی که بیشترین ارتباط را در این خصوص دارند هماهنگی هایی از قبل صورت پذیرد و حتی میتوان تفاهم نامه هایی نیز تنظیم و امضاء نمود.

تقدیر و تشکر:

نویسندگان، مراتب سپاس و قدردانی خود را از مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر به دلیل تصویب و حمایت مالی از این طرح اعلام می دارند.

و با تشکر صمیمانه و قدردانی از :

- مدیریت محترم بیمارستان ۱۷ شهریور برازجان
- مدیریت محترم بیمارستان شهدای خلیج فارس بوشهر
- مسئولین محترم آزمایشگاه های خصوصی مهر، حکیم و آزمایشگاه مرکزی در بوشهر
- مسئولین محترم آزمایشگاه خصوصی نوید و پاستور در برازجان
- تمامی کارشناسان آزمایشگاه های میکرو.ب شناسی بیمارستان های ۱۷ شهریور و شهدای خلیج فارس
- تمامی کارشناسان آزمایشگاه های خصوصی و مرکزی در این مطالعه

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول
۱	خلاصه گزارش (فارسی)
	فصل دوم
۲	مقدمه
۵	مواد و روش ها
۸	یافته ها
۱۱	بحث و نتیجه گیری
	فصل سوم
۱۶	منابع
۲۰	مقالات ارائه شده از طرح در سمینارها و کنگره ها
۲۱	مقالات ارائه شده از طرح در مجلات علمی
۲۲	خلاصه گزارش (انگلیسی)

فهرست جداول ، اشکال و نمودار ها

صفحه

عنوان

-
- | | |
|----|---|
| ۶ | جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه |
| ۷ | جدول ۲: ژنوتایپ های Quadruplex و مراحل مورد نیاز برای قرار گیری ایزوله های
اشریشیا کلی در گروه های فیلوژنتیکی |
| ۹ | جدول ۳: میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در میان گروه های مختلف فیلوژنتیکی سویه های
اشریشیا کلی |
| ۸ | شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز حاصل از PCR ژن های مورد بررسی |
| ۱۰ | نمودار ۱: فراوانی ایزوله های مقاوم به چند دارو در گروه های مختلف فیلوژنی |

خلاصه گزارش:

سابقه و هدف: عفونت های دستگاه ادراری جزء شایع ترین بیماری های عفونی می باشند . امروزه باکتری *اشریشیا کلی* به عنوان غالب ترین عامل ایجاد کننده عفونت ادراری در ۹۰-۸۰ درصد از بیماران گزارش شده است . این مطالعه با هدف ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *E. coli* جداسازی شده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری و نیز گروه بندی فیلوژنتیکی این سویه ها انجام گرفت.

مواد و روش کار: در مجموع ۶۴۰۶ نمونه کشت مشکوک به عفونت ادراری از ۲ بیمارستان و ۵ آزمایشگاه خصوصی در شهرهای برازجان و بوشهر جمع آوری گردید. به منظور جداسازی سویه های *E. coli* تمامی نمونه ها با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک (Kirby-Bauer) آزمون حساسیت دارویی بر روی ۱۸ گروه مختلف آنتی بیوتیکی انجام شد . به منظور تایپینگ و گروه بندی فیلوژنتیک سویه های *E. coli* از روش Multiplex PCR و پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید.

نتایج: در مجموع ۱۴۰ سویه *E. coli* جداسازی گردید. بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین (۸۲/۱٪) و آمپی سیلین (۸۰٪) و کمترین آن نسبت به مروپنم (۰/۷٪) و نیتروفورانتوئین (۱/۴٪) گزارش گردید. ارزیابی گروه فیلوژنتیکی نشان داد که گروه B2 و A به ترتیب با ۳۹/۳٪ و ۰/۷٪ بیشترین و کمترین فراوانی را در میان گروه ها داشتند. همچنین بیشتر سویه های مقاوم به چند دارو متعلق به گروه فیلوژنتیک B2 بودند.

نتیجه گیری: پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران از روش جدید کلرمانت و همکاران برای ارزیابی گروه های مختلف فیلوژنتیکی سویه های *E. coli* استفاده نمود. ۲۵ درصد سویه ها به گروه های جدید فیلوژنتیکی E, F, C, Clade I تعلق داشتند. نتایج به دست آمده در این مطالعه می تواند در راستای کنترل عفونت های بیمارستانی، مطالعات اپیدمیولوژیکی و آگاهی از پاتورن عفونت ها مفید می باشد.

واژگان کلیدی: *E. coli*، فیلوژنتیک تایپینگ، مقاومت آنتی بیوتیکی، عفونت دستگاه ادراری

مقدمه

عفونت های مجاری ادراری جزء شایع ترین بیماری های عفونی می باشند . به طوری که سالیانه در حدود ۱۵۰ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا می شوند (۱). امروزه باکتری *E. coli* به عنوان غالب ترین عامل ایجاد کننده عفونت های دستگاه ادراری در ۸۰-۹۰ درصد از بیماران گزارش شده اند (۲). اگرچه عفونت های مجاری ادراری در هر دو جنس مونث و مذکر مشاهده می گردد، مطالعات آزمایشگاهی حاکی از آن است که به دلیل وجود تفاوت های فیزیولوژیکی و آناتومی به طور کلی این عفونت در زنان نسبت به مردان شیوع بیشتری دارد (۳ و ۴). از میان پاتوژن های ادراری گونه */شرشیاکلی* (۷۲/۷-۵۷/۹ درصد)، گونه *کلبسیلا* (۹/۸۸-۲/۷ درصد)، گونه *پروتئوس* (۷/۱-۵/۶ درصد)، گونه *سودوموناس* (۶/۵۲-۲/۹ درصد)، گونه */استرپتوکوکوس* (۱۷/۸-۲/۶۸ درصد)، گونه */استافیلوکوکوس* (۶/۳۵-۰/۵ درصد) عمده ترین باکتری های عفونت زای مجاری ادراری به حساب می آیند (۵-۸).

با بررسی کتابخانه ژنی گروه های مختلف فیلوژنتیک سویه های *E. coli* و نیز تعیین خصوصیت قطعات ژنتیکی متفاوت، مشخص شده است که ژن ها یا قطعات خاصی از DNA باکتری می توانند به عنوان مارکرهای تخصصی در گروه بندی فیلوژنتیک سویه های *E. coli* نقش مهمی ایفا نمایند (۹ و ۱۰) این سه مارکر پیشنهاد شده عبارتند از : ۱- *chuA*: ژنی که برای انتقال هم در *E. coli* O157:H7 انتروهموراژیک ضروری است (۹).

۲- *yjaA*: ژنی که اولین بار در توالی کامل ژنوم *E. coli* K-12 شناسایی شده و عملکرد آن هنوز ناشناخته باقیمانده است (۱۱-۱۳).

۳- قطعه TSPE4.C2 از DNA که از کتابخانه ژنی *E. coli* به دست آمده است (۹).

سویه های *E. coli* بر اساس چنین ساختارهای ژنتیکی با روش ریبوتایپینگ و یا روش الکتروفورز آنزیم چند لوکوسی (Multi Locus Enzyme Electrophoresis or MLEE) به گروه های فیلوژنتیکی مختلفی از جمله A, B1, B2 و D تقسیم بندی شده اند (۱۴ و ۱۵).

کلرمانت (Clermont) و همکاران در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار از روش PCR به منظور ارزیابی ژن های *yjaA*، *chuA* و قطعه TSPE4.C2 در ۲۳۰ سویه *E. coli* استفاده نمودند. از آن به بعد از تکنیک PCR به عنوان روشی ساده تر و سریع تر در مطالعات گروه بندی فیلوژنتیک استفاده گردید؛ زیرا دو تکنیک مرجع دیگر (ریبوتایپینگ و MLEE) پیچیده و زمان بر بوده و به مجموعه ای از سویه های الگو نیاز دارند (۱۰). این محققان بر اساس حضور یا عدم حضور ژن های مذکور، سویه های *E. coli* را در چهار گروه فیلوژنتیکی B2, D, B1 و A قرار دادند.

در سال ۲۰۱۳ کلرمانت و همکاران با توجه به اطلاعات مربوط به توالی چند لوکوسی (MLST) سویه های *E. coli* در میزبان ها و زیستگاه های مختلف دریافتند که ۸۰ تا ۸۵ درصد طبقه بندی گروه های فیلوژنتیکی صحیح است (۱۶). اما قطعه ای ژنی از سویه ها با ژنوتایپ های A0, D1 و D2 به صورت نادرست طبقه بندی شده اند. بر همین اساس در سال ۲۰۱۳ کلرمانت و همکاران ژن هدف دیگری (*arpa*) را به ۳ ژن ذکر شده قبلی اضافه نمودند و یک quadruplex PCR را به جای روش قبلی به کار بردند. در روش جدید سویه های *E. coli* به جای ۴ گروه به ۸ گروه فیلوژنتیکی شامل A, B1, B2, C, D, E, F و clade I طبقه بندی می شوند (۱۶).

بیش از پنجاه سال از زمان استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان سریع و موثر بیماری های عفونی می گذرد. در طول این دوران، تغییرات زیادی در نوع آنتی بیوتیک های مصرفی و نیز حساسیت و مقاومت باکتری ها نسبت

به آنها ایجاد شده است (۱۷). به همین دلیل امروزه یکی از مهم ترین مسائل در درمان بیماری های عفونی، مقاومت باکتری های پاتوژن نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد . اساس درمان مناسب در عفونت های ادراری، انتخاب آنتی بیوتیکی با کارایی بالا و ارزان می باشد. با توجه به افزایش روزافزون مصرف آنتی بیوتیک و متعاقب آن افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی و نیز متفاوت بودن حساسیت *E. coli* در مناطق مختلف دنیا، بررسی مقاومت های آنتی بیوتیکی این باکتری ضروری به نظر می رسد. این مطالعه برای اولین بار با هدف گروه بندی جدید فیلوژنتیکی سویه های *E. coli* جداسازی شده از بیماران مشکوک به عفونت ادراری و نیز ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها انجام گرفت.